



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08196618 A**(43) Date of publication of application: **06.08.96**

(51) Int. Cl. **A61L 27/00**  
**A61F 2/10**  
**A61F 2/28**

(21) Application number: **07007845**(22) Date of filing: **23.01.95**(71) Applicant: **TERUMO CORP**

(72) Inventor: **MATSUI RISA KO**  
**HAYAKAWA KOICHI**  
**KOIDE MIKIO**

(54) **CELL INVASIVE COLLAGEN FORMULATION,  
 ARTIFICIAL SKIN AND THEIR MANUFACTURE**

## (57) Abstract:

**PURPOSE:** To provide a bone-repairing collagen formulation which is strengthened in its collagenase resistance, does not induce foreign body reaction and has high biocompatibility with bone, by using a sponge-shaped collagen matrix in which many holes exist and specifying the diameter of the hole.

**CONSTITUTION:** A cell invasive collagen formulation is composed of a sponge-shaped collagen matrix in which many holes are present. Here, diameter of the holes is

100 to 1000 $\mu$ m and the holes have an asymmetric structure. The collagen matrix is made out of a mixture of fibrous atherocollagen and denatured atherocollagen whose helix content is 0 to 80%. Furthermore, a bone-repairing material is formed out of a cell invasive collagen formulation. On the other hand, the cell invasive collagen formulation is manufactured by processing under reduced pressure and high temperature after a raw material collagen solution is foamed and freeze-dried. An injured part contact layer of an artificial skin is formed of the sponge-shaped collagen matrix.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-196618

(43)公開日 平成8年(1996)8月6日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 L 27/00	V			
	C			
A 6 1 F 2/10				
2/28				

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 7 頁)

(21)出願番号	特願平7-7845	(71)出願人	000109543 テルモ株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
(22)出願日	平成7年(1995)1月23日	(72)発明者	松井 理佐子 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内
		(72)発明者	早川 浩一 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内
		(72)発明者	小出 幹夫 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内

(54)【発明の名称】 細胞侵入性コラーゲン製剤、および人工皮膚、およびそれらの製造方法

(57)【要約】

【構成】コラーゲン溶液を攪拌して泡立てることにより得られ、100～1000 $\mu$ mの空孔を有する。

【効果】優れた細胞侵入性を有する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】多数の空孔が存在するスポンジ状のコラーゲンマトリックスからなり、前記空孔の直径が100～1000 $\mu$ mであることを特徴とする細胞侵入性コラーゲン製剤。

【請求項2】前記コラーゲンマトリックスに存在する空孔が非対称性構造を有することを特徴とする請求項1に記載の細胞侵入性コラーゲン製剤。

【請求項3】前記コラーゲンマトリックスが線維化アテロコラーゲンとヘリックス含量が0～80%の変性アテロコラーゲンの混合物であることを特徴とする請求項1乃至2に記載の細胞侵入性コラーゲン製剤。

【請求項4】請求項1乃至3記載の細胞侵入性コラーゲン製剤からなる骨修復材。

【請求項5】原料コラーゲン溶液を泡立て凍結乾燥させた後、低下下、高温で処理することを特徴とする請求項1乃至3に記載の細胞侵入性コラーゲン製剤の製造方法。

【請求項6】創傷部接触層とその上に積層された支持層から構成され、前記創傷部接触層が多数の空孔が存在するスポンジ状のコラーゲンマトリックスからなり、前記空孔の直径が100～1000 $\mu$ mであることを特徴とする人工皮膚。

【請求項7】前記コラーゲンマトリックスに存在する空孔が非対称性構造を有することを特徴とする請求項6に記載の人工皮膚。

【請求項8】前記コラーゲンマトリックスが線維化アテロコラーゲンとヘリックス含量が0～80%の変性アテロコラーゲンの混合物であることを特徴とする請求項6乃至7に記載の人工皮膚。

【請求項9】原料コラーゲン溶液を泡立て、上面が開口し下面が平底である容器に流し込み凍結乾燥させ、多数の空孔が存在し前記容器上面側を上面、下面側を下面とするスポンジ状のコラーゲンマトリックスを得て、前記コラーゲンマトリックスの上面に水分透過性物質の薄膜を積層し、低下下、高温で処理することを特徴とする請求項6乃至8に記載の人工皮膚の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用部分野】本発明は、細胞侵入性コラーゲン製剤、および人工皮膚、およびそれらの製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】骨組織に何らかに異常や欠損が生じた場合、自己の他部位から採取した骨の移植が好ましいがその供給が困難な場合が多く、人工物をもって代替しようとする発想は古くから存在した。それらの人工物にはチタニウム、ステンレス等の金属類、ハイドロキシアパタイト等のセラミックス類がある。しかし、金属類は生体骨との直接的な接合が得られず、生体骨との間隔に軟組織

が新生して介在するようになる為、長期安定性に欠ける。また、セラミックス類は生体骨との直接的な接合が得られるか、それ自身の物性が脆く、骨の物理的機能上問題がある。骨の主たる成分は有機物としてコラーゲンと、ハイドロキシアパタイトのような無機物である為、コラーゲン製剤を利用しようとする試みがいくつかなされている。

【0003】牛の皮膚由来の凍結乾燥したアテロコラーゲンを $\gamma$ 線照射したものがコラーゲンフリース (collagen fleece) という名称で市販されており、これを実際に骨再構成に応用し、これを使わなかった場合と比べ、骨欠損部の骨形成が早まったというウルリッチとゲルトラッド (Ulrich Joos & Gertrued Ochs) の報告がある [Ulrich Joos & Gertrued Ochs, Biomaterials, 1, 23 (1980)]。また、実質的に架橋しないことを特徴とする、無機成分を除去した骨起源のコラーゲンの精製アテロペプチド製剤から成る骨コラーゲン粉末、精製アテロペプチド再構成微線維状皮膚コラーゲン、精製アテロペプチド再構成微線維状皮膚コラーゲンの凍結乾燥ゲル及び、上記の混合物からなるコラーゲン製剤を用いるドナルド・ジョー・ウォレスらの方法が特告平3-26616号で開示されている。

【0004】また、皮膚などの生体組織に何らかの異常が生じた場合、自己の他部位の組織あるいは、親族などの免疫原生の少ない個体からの同種移植が好ましいが、当然免疫拒絶反応の対象となるケースが多く、そのため組織や免疫系細胞から不感作であるような、いわゆる組織反応が低い物質を求める努力が続けられている。一方、熱傷、外傷、手術創などの創傷部分を保護し治癒を促進するために、患部に一時的に適用される人工皮膚として、従来はガーゼ、脱脂綿等が用いられていたが、これらは感染防止能力が低く、かつ滲出液を吸収してしまうため創面が乾燥固着してしまい、剥がすときに出血、痛み、治癒阻害を伴った。また、軟膏等を併用することもあるが、この場合は逆に滲出液の貯留、創面の過度の湿潤が問題となっている。

【0005】これらに代わるものとして、ポリウレタンフィルム、シリコン性ガーゼ、シリコンゴム製及びベロア状の表面を有するナイロン、テフロンなどの合成繊維シート等の人工材料被覆材や、凍結乾燥豚皮、キチン不織布、コラーゲン不織布、ポリロイシン膜などの生体由来材料が知られている。ポリウレタンを代表とする合成高分子をより高透過性化させる方向の研究などはその一例である。しかし、人工材料は、患部との密着性、生体適合性、固着防止効果等で問題があり、一方生体由来材料では、抗原性、創面での融解、感染、滲出液による劣化がみられる。また、コラーゲン処理されたナイロンメッシュとシリコン膜からなる被覆材が開発され、創面の密着性、適度な水分透過を有するが、創面への固着が強く、創面の治癒を遅らせるという欠点があった。

また、これとは全く正反対に、免疫反応を引き起こす前に速やかに物質が組織と同化してしまうことにより器官としての機能を付与するという考え方がある。その素材として生体由来材料であるコラーゲン等を選択し、線維芽細胞を早期に侵入させて、結合組織を構築させる目的の組織に覆わせて免疫反応を免れる考え方で、後者の方がより理想に近い形である。しかし、コラーゲンをスポンジ状に加工したもので、ムコ多糖含有コラーゲン膜などがあるが、生体内での強度を保つために強度な化学架橋を行っているが、このために異物性が高くなり治癒を遅らせ、かつ強度的に弱いために手術的な操作性が悪かった。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】再線維化したアテロコラーゲンは、例えば異種の動物であってもコラーゲンの免疫活性決定基とも言うべきテロペプチド部分が切断・除去されている為、ヒトの骨組織に対する親和性は大きいと考えられる。しかしながら、コラーゲン分子間に架橋を付加しないと、生体内でコラゲナーゼで容易に分解吸収されるばかりか、ゲルを凍結乾燥したものを、37℃生理食塩水に浸漬しておくだけでも数時間以内に溶解することがわかっている。かかるコラーゲン製剤を骨再構成に応用しようとしても生体内安定性がないため、初期の目的が達成できない。

【0007】一方γ線を照射したり、ヘキサメチレンジイソシアネートやグルタルアルデヒド等の薬品で処理すると、コラーゲン分子間に架橋が導入され、物性やコラゲナーゼ耐性が強化できる。例えば凍結乾燥コラーゲン製剤をヘキサメチレンジイソシアネートで架橋すると、コラゲナーゼ溶液(100unit/ml)に37℃で7日間浸漬しても形態に変化が見られない。ところが、かかる強固な架橋を導入すると生体内に埋植した場合、コラーゲンに対する異物反応のみが強くあらわれ、貪食細胞による貪食が認められるようになる。つまり、物性やコラゲナーゼ耐性の強度と、組織・細胞に対する親和性という生物学的性能向上が困難な相反する事象であり、一定期間そこに存在し異物反応がないまま骨再構成を導くコラーゲン製剤は従来求め得られなかった。そこで、本発明は、コラゲナーゼ耐性が強化され、かつ異物反応を招かず、骨に対する生体適合性の高い、細胞侵入性骨修復用コラーゲン製剤を提供することを目的とする。

【0008】前述のように、非架橋型のコラーゲンスポンジの人工皮膚では、細胞や血管の侵入による自己組織化の速度が問題となるが、化学架橋型のコラーゲンスポンジの人工皮膚では細胞侵入のための適度な孔径のスポンジ構造とその構造の使用時の圧迫に対する維持が問題となっている。例えば、生分解性ポリエステルを分散させたことによりスポンジ構造を維持させたり、凍結乾燥時の温度を変えることによりスポンジ孔径を制御して細胞侵入性を高めようとしているが、異物性の増加や材料

10

20

30

40

50

自体に亀裂が生じるなどの問題が起こっている。このため、細胞や血管侵入のための適度な空孔がスポンジ内に存在すれば、細胞や血管が侵入して、自己組織化が早まり、早期に分層植皮を移植するのに良好な母床になることも可能となる。

#### 【0009】

【課題を解決するために手段】上記の目的は下記の構成を有する細胞侵入性コラーゲン製剤、および人工皮膚およびそれらの製造方法によって達成される。

(1) 多数の空孔が存在するスポンジ状のコラーゲンマトリックスからなり、前記空孔の直径が100～1000μmであることを特徴とする細胞侵入性コラーゲン製剤。

(2) 前記コラーゲンマトリックスに存在する空孔が非対称性構造を有することを特徴とする上記(1)に記載の細胞侵入性コラーゲン製剤。

【0010】(3) 前記コラーゲンマトリックスが線維化アテロコラーゲンとヘリックス含量が0～80%の変性アテロコラーゲンの混合物であることを特徴とする上記(1)乃至(2)に記載の細胞侵入性コラーゲン製剤。

(4) 上記(1)～(3)に記載の細胞侵入性コラーゲン製剤からなる骨修復材。

(5) 原料コラーゲン溶液を泡立て、-40℃以下で凍結乾燥させた後、低圧下、高温で処理することを特徴とする上記(1)乃至(3)に記載の細胞侵入性コラーゲン製剤の製造方法。

(6) 創傷部接触層とその上に積層された支持層から構成され、前記創傷部接触層が多数の空孔が存在するスポンジ状のコラーゲンマトリックスからなり、前記空孔の直径が100～1000μmであることを特徴とする人工皮膚。

【0011】(7) 前記コラーゲンマトリックスに存在する空孔が非対称性構造を有することを特徴とする上記(6)に記載の人工皮膚。

(8) 前記コラーゲンマトリックスが線維化アテロコラーゲンとヘリックス含量が0～80%の変性アテロコラーゲンの混合物であることを特徴とする上記(6)乃至(7)に記載の人工皮膚。

(9) 原料コラーゲン溶液を泡立て、上面が開口し下面が平底である容器に流し込み、-40℃以下で凍結乾燥させ、多数の空孔が存在し前記容器上面側を上面、下面側を下面とするスポンジ状のコラーゲンマトリックスを得て、前記コラーゲンマトリックスの上面に水分透過性物質の薄膜を積層し、低圧下、高温で処理することを特徴とする上記(6)乃至(8)に記載の人工皮膚の製造方法。

【0012】本発明においてコラーゲンマトリックスは、多数の空孔を有するスポンジ状の構造を有し、その空孔の直径は100～1000μmであり、より好まし

くは200~500 $\mu$ mである。また、スポンジ状の構造は非対称性構造を成していることが好ましい。本発明において非対称性構造とは、本発明の範囲内において空孔の直径が大きいものと小さいものとが各々群を成して構成されていることを示す。具体的には、骨欠損部や皮膚の創傷面などの生体組織と接触する側の面側に比較的直径の大きい空孔が存在し、その対面側に比較的直径の小さい空孔が存在することを示す。

【0013】本発明において空孔の形状は何ら限定されるものではなく、また、連通孔であっても良い。連通孔の場合の非対称性構造とは、生体組織と接触する側の面側の直径が大きく対面側に近づくにつれてテーパ状に直径が小さくなることを示す。

【0014】本発明において原料となるコラーゲンは何ら限定されないが、特に好ましくは線維化アテロコラーゲンとヘリックス含量が0~80%の変性アテロコラーゲンの混合物が良い。また変性コラーゲンを混合することにより初期の細胞侵入性をより高めることができると共に非特異的なコラーゲンの負栄養性石灰沈着も防止できる。

【0015】本発明においてコラーゲンマトリックスは、30~80%の架橋度を有し、より好ましくは40~70%の架橋度を有する。低い架橋度であるとコラーゲナーゼで容易に分解吸収され、また高い強固な架橋を導入すると生体内に埋植した場合、コラーゲンに対する異物反応のみが強くあらわれるため、30~80%、より好ましくは40~70%の架橋度がよい。このようにして得られたコラーゲンマトリックスは、37℃生食中に浸漬しても一部溶解するが、残りの部分は溶解せずスポンジ構造を維持する。

【0016】本発明においての架橋処理は、特に限定されるものではなく架橋度を上記範囲内に調整できるものであれば良い。しかしながら、 $\gamma$ 線や薬品で架橋処理したコラーゲンマトリックスが一樣に食食細胞浸潤等の異物反応を招いてしまうのに対し、熱脱水架橋処理されたコラーゲンマトリックスは、未分化間葉系細胞や骨芽細胞、毛細血管の侵入が観察されるが、異物反応は認められず、生体適合性が高いことから、熱脱水架橋が最も好ましい。これらの架橋処理を行うことにより、動物の骨欠損部や皮膚の創傷面、それ以外の軟組織や硬組織に埋植しても少なくとも4週間はそこに存在し続けることができる。

【0017】本発明における架橋度とは、次の方法で測定したものをいう。コラーゲンマトリックスを0.5mM HCl中で4℃、15~16時間攪拌後、3000rpmで15分間遠心分離を行ない上清と残渣に分ける。この時の上清をAとする。次に、残渣に8M尿素を加え、60℃で30分間の加熱を行ない、3000rpmで15分間遠心分離し、残渣と上清に分ける。この時点の上清をB、残渣をCとする。ついで、AとBの液中の蛋白質濃

度を測定し、それに各々の体積を掛けたものを $W_A$ 、 $W_B$ とする。また、Cの重量を $W_C$ とする。

【0018】そして、架橋度(%) =  $[(W_B + W_C) / (W_A + W_B + W_C)] \times 100$ 、とする。

【0019】次に、本発明のコラーゲンマトリックスの製造方法を示す。まずコラーゲン溶液を調製する。これを2分して一方はそのまま放置し、他方はこのコラーゲン溶液を40℃以上で加熱処理などにより変性させることにより、変性コラーゲンとする。36℃に保ちながら、ワーリングブレンダーでホモジナイズして泡立てる。放置した溶液をリン酸緩衝液で37℃で線維化させ、所定の濃度の濃縮した後、泡立てた変性コラーゲン溶液と混合して、所定の上面が開口している容器に流し込み、凍結乾燥を行い本発明のコラーゲンマトリックスを作製する。この際、コラーゲンマトリックス中において径の大きな空孔が容器に接触する側(下面)に、径の小さな空孔が容器の開口している側(上面)に形成される。

【0020】また製造する際に、変性コラーゲンの濃度が1%以下では、線維化コラーゲンと混合すると、泡立っていた変性コラーゲンが消えてしまうため、変性コラーゲンは1~2%の濃度が好ましい。また、泡立ての温度は20~40℃が好ましく、より好ましくは30~37℃である。

【0021】また、本発明においてはコラーゲンマトリックスに生理活性物質を配合しても良い。生理活性物質は創傷面の治癒促進を目的とし、特に限定しないが、ヘパリンが挙げられ、他には血小板由来増殖因子(PDGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、内皮細胞増殖因子(ECGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF- $\beta$ )などが挙げられる。

【0022】次に、本発明の人工皮膚は、支持層と上記のコラーゲンマトリックスの2層構造からなる。本発明の人工皮膚を創面に使用することにより、滲出液の流出が多くなり膜が浮いてしまい、治癒を遅らせる可能性がある。このため、空孔がマトリックス中に存在することにより、創傷面への密着性を向上させることができる。

【0023】支持層としては、特に限定されないがその材料としては、シリコーン、ポリウレタン、ポリオレフィン、スチレン-ブタジエンブロックポリマー、ポリテトラフルオロエチレンなどが挙げられ、厚さは50~500 $\mu$ m、好ましくは100~200 $\mu$ m、水蒸気透過率は500~5000g/m<sup>2</sup>・24h、好ましくは700~2000g/m<sup>2</sup>・24hである。

【0024】また、本発明の人工皮膚は、支持層の中に上記の支持層と同じ材料あるいは異なる材料からなる繊維状の補強材で補強することにより、外部からの圧迫によるコラーゲンマトリックスの変形や創面からの剥離を防ぎ、スポンジ構造の変形による細胞侵入性の低下が防止できる。また、使用時に適度な剛性を持たせることに

より、貼付するときのヨレや剥がれを防止できる。更に、膜内に繊維が存在する事により、創面固定時の縫合がしやすく、創面からの剥がれなどを少なくできる。また更に、移植して一定期間たった後、上部の支持層を剥がし、自家の分層植皮を行うことにより、より良い分層植皮の生着と治癒が得られる。

【0025】次に、本発明の人工皮膚の製造方法を示す。(1) まずコラーゲン溶液を調製する。これを2分して一方はそのまま放置し、他方はこのコラーゲン溶液を40℃以上で加熱処理などにより変性させることにより、変性コラーゲンとする。36℃に保ちながら、ワーリングブレンダーでホモジナイズして泡立てる。放置した溶液をリン酸緩衝液で37℃で繊維化させ、所定の濃度の濃縮した後、泡立てた変性コラーゲン溶液と混合して、所定の上面が開いている容器に流し込み、凍結乾燥を行い本発明のコラーゲンマトリックスを作製する。この際、コラーゲンマトリックス中において径の大きな空孔が容器に接触する側(下面)に、径の小さな空孔が容器の開いている側(上面)に形成される。

【0026】(2) 次にテフロン製の基板上にシリコン等の水分透過性物質の溶液を延展して製膜し、該膜が未だ粘着性を有する状態において、上記のコラーゲンマトリックス層をその上方の面が該膜に付着するように載置し、乾燥し、さらに必要に応じて熱処理を施し、該膜を硬化させて、支持層の上方の面に水分透過調節膜を付着させる。(3) 最後に基板上よりこの複合膜を剥離し、真空下で熱脱水架橋を施すと所望の人工皮膚を得ることができる。

【0027】

【実施例】以下、実施例を示し本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0028】(実施例1) コラーゲンスポンジの作製

#### ①熱変性アテロコラーゲンの調整

アテロコラーゲン(高研株式会社製)を4℃下でpH3の塩酸溶液に溶解し、0.2~0.3%の溶液に調整する。この溶液を0.2μmのフィルターで濾過滅菌し、凍結乾燥した。得られたアテロコラーゲン粉末をRO水で膨潤させた後、60℃の恒温槽中で30分以上変性させた。更に、熱変性したアテロコラーゲンを36℃の恒温槽中で2時間浸漬した後、ワーリングブレンダーでホモジナイズして泡立てると、クリーム状の熱変性アテロコラーゲン溶液が得られた。

【0029】②線維化アテロコラーゲン溶液の調整

アテロコラーゲンをpH3の塩酸溶液に溶解し、0.2~0.3%の溶液に調整する。この溶液を0.2μmのフィルターで濾過滅菌しpH7.4のリン酸緩衝液を加えて、最終リン酸濃度が30mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウムであり、コラーゲン濃度が0.25%となるように調整した。この溶液を37℃で3時間以上放置し、コラーゲンを線維状態にした。線維は遠心分離

機により約2~4%程度に濃縮した。

【0030】③ヘパリン・線維化アテロコラーゲン溶液の調整

上記②と同様な方法で0.25%のアテロコラーゲン溶液を調整した。生理活性物質としてコラーゲン量に対して、0.25%となるようにヘパリンを添加した。この溶液を37℃で3時間以上放置し、コラーゲンを線維状態にした。線維は遠心分離機により約2~4%程度に濃縮した。

10 【0031】④線維化アテロコラーゲン熱変性アテロコラーゲン

上記②で調整した線維化アテロコラーゲン溶液と上記①で調整したクリーム状の1.5%熱変性アテロコラーゲン溶液を混合し、十分に混ぜ合わせた。この時クリーム状の泡は混合しても消えていなかった。この溶液を、下面に底を有し上面が開くプラスチック製シャーレに流し込み、-40℃で急速凍結した後、乾燥を行ない、径の大きな空孔が下面に、径の小さな空孔が上面に形成されコラーゲンスポンジを作製した。

20 【0032】⑤ヘパリン・線維化アテロコラーゲン熱変性アテロコラーゲン

上記③で調整したヘパリン・熱変性アテロコラーゲン溶液と上記①で調整したクリーム状の1.5%熱変性アテロコラーゲン溶液を混合し、十分に混ぜ合わせた。この時クリーム状の泡は混合しても消えていなかった。この溶液を、下面に底を有し上面が開くプラスチック製シャーレに流し込み、-40℃で急速凍結した後、乾燥を行ない、径の大きな空孔が下面に、径の小さな空孔がコラーゲンスポンジを作製した。

30 【0033】(実施例2) 細胞侵入性コラーゲン製剤の作製(1)

実施例1-④にて作製したコラーゲンマトリックスを0.05トル(Torr)以下、110℃で3時間熱脱水架橋を施し、本発明の細胞侵入性コラーゲン製剤を得た。この時の架橋度は52%であった。

【0034】得られた細胞侵入性コラーゲン製剤をラットの頭蓋頭頂骨上に埋植して骨の再構成を評価した。動物は約700gのSprague-Dawley(SD)系雄性ラットを用いた。ペントバルビタールを33mg/kgB.W腹腔内投与して麻酔した後、腹立に固定した。開頭し結合組織を剥離し、骨面を露出させた。骨膜を除去し頭蓋骨を研磨することにより骨欠損創を作製した。細胞侵入性コラーゲン製剤は実施例の他に比較例を使用した。埋植後、4週間目に剖検に供し、頭蓋骨を摘出しホルマリン固定した。2~3mm位の厚みに切り出した後、ギ酸-ホルマリン水溶液にて脱灰を行なった脱灰完了後に充分水洗し、埋植した細胞侵入性コラーゲン製剤及び周辺骨組織を病理組織学的に評価した。その結果を表1に示す。

50 【0035】(実施例3) 細胞侵入性コラーゲン製剤の作製(2)



実施例1-⑤にて作製したコラーゲンマトリックスを0.05トル(Torr)以下、110℃で3時間熱脱水架橋を施し、本発明の細胞侵入性コラーゲン製剤を得た。この時の架橋度は65%であった。得られた細胞侵入性コラーゲン製剤を、実施例2と同様に頭蓋頭頂骨埋入法により埋植した細胞侵入性コラーゲン製剤及び周辺骨組織を病理組織学的に評価した。その結果を表1に示す。

【0036】(比較例1) 実施例1-②と同様の方法で線維化アテロコラーゲンを得た。ワーリングブレンダーでホモナイズさせない以外は実施例1-①と同様の方法で熱変性アテロコラーゲンを得て、線維化アテロコラーゲンの15%となるように線維化アテロコラーゲンに加え、線維化アテロコラーゲン-熱変性アテロコラーゲンの混合物を得た。下面に底を有し上面が開口するプラスチック製シャーレに流し込み、-40℃で急速凍結しコラーゲンスポンジを得た後、該コラーゲンスポンジを乾燥させ、0.05Torr以下、110℃で1時間熱脱水架橋を施し細胞侵入性コラーゲン製剤を得た。この時の架橋度は14%であった。

【0037】得られた細胞侵入性コラーゲン製剤は、実\*20

\*実施例2と同様に頭蓋頭頂骨埋入法により埋植した細胞侵入性コラーゲン製剤及び周辺骨組織を病理組織学的に評価された。その結果を表1に示す。

【0038】(比較例2) 実施例1-②と同様の方法で線維化アテロコラーゲンを得て、実施例1-①と同様の方法で熱変性アテロコラーゲンを得て、線維化アテロコラーゲンの15%となるように線維化アテロコラーゲンに加え、線維化アテロコラーゲン-熱変性アテロコラーゲンの混合物を得た。下面に底を有し上面が開口するプラスチック製シャーレに流し込み、-40℃で急速凍結しコラーゲンスポンジを得た後、該コラーゲンスポンジを乾燥させ、0.05Torr以下、110℃で24時間熱脱水架橋を施し細胞侵入性コラーゲン製剤を得た。この時の架橋度は85%であった。

【0039】得られた細胞侵入性コラーゲン製剤は、実施例1と同様に頭蓋頭頂骨埋入法により埋植した細胞侵入性コラーゲン製剤及び周辺骨組織を病理組織学的に評価された。その結果を表1に示す。

【0040】

【表1】

表1 頭蓋頭頂骨埋入法の病理所見(4週間後)

試料	好中球	単核球	線維芽細胞	異栄養性石灰化	試料残存性	骨形成
実施例2	-	-	+++	-	+++	++
実施例3	-	-	+++	-	+++	++
比較例1	-	-	-	-	-	+
比較例2	+	++	+	-	+	++
未充填	-	-	-	-	-	+

+++ : 非常に優れた効果が見られる

++ : 優れた効果が見られる

+: 効果が見られる

- : 効果が見られない

【0041】実施例1及び2の細胞侵入性コラーゲン製剤では著明な骨の再構成が認められたが、比較例2の細胞侵入性コラーゲン製剤では炎症性細胞の浸潤が、比較例1の細胞侵入性コラーゲン製剤ではコラーゲンの消失が著明に認められ、骨の再構成は認められなかった。

【0042】(実施例4) 人工皮膚の作製(1)

メディカルグレード サイラステイクType A シリコーン(ダウ・コーニング社製)をヘキサンで67%となるように希釈し、溶解する。この溶液をテフロン板上に流延し、精密被覆用具(アプリケーター)で300μmに伸ばし、この上に実施例1-④で得られたコラーゲンスポンジをのせて接着した。この複合化膜は60℃、3時間以上で硬化させた。最後に、0.05Torr以下、110℃以上で3時間以上熱処理を施し、本発明の人工皮膚を得た。

【0043】次に、得られた人工皮膚をラット背部全層欠損層へ貼付し、線維芽細胞の侵入性を評価した。Ha

rtley系モルモット(8週令)をネブタール麻酔下で剃毛し、イソジンを消毒した背部に皮下皮筋を残した2cm角の全層欠損層を作製し、止血した後、人工皮膚を貼付した。シリコーン層辺縁を縫合糸で16ヶ所結糸固定した。その上にメロリン(S&N社製)をのせ、エラスチンテープで圧迫固定した。移植7、10、14日目で経時的に観察し、病理組織学的に評価した。その結果を表2に示した。

【0044】(実施例5) 人工皮膚の作製(2)

実施例4で得られたシリコーン膜上に実施例1-⑤及び比較例1で得られたコラーゲンスポンジをのせて接着し、以下実施例4と同様の処理を行い、本発明の人工皮膚を得た。得られた人工皮膚は、実施例4と同様にラット背部全層欠損層への貼付方法により試料への線維芽細胞の侵入性を病理組織学的に評価した。その結果を表2に示す。

【0045】(比較例3) 実施例4で得られたシリコー

ン膜上に比較例 1 で得られたコラーゲンスポンジをのせて接着し、以下実施例 4 と同様の処理を行い、比較としての人工皮膚を得た。得られた人工皮膚は、実施例 4 と同様にラット背部全層欠損層への貼付方法により試料への線維芽細胞の侵入性を病理組織学的に評価した。その結果を表 2 に示す。

#### 【0046】(実施例 6) 人工皮膚の作製 (3)

上記で得られたシリコーン・ヘキサン溶液をテフロン板上に流延し、アプリーケーターで  $300\mu\text{m}$  に伸ばし、この上にポリエステル製織布 (繊維厚  $100\mu\text{m}$ 、目付け  $70\text{g}/\text{cm}^2$ ) をのせ、さらにその上に実施例 1-④で得られたコラーゲンスポンジをのせて接着した。以下実施例 4 と同様の処理を行い、本発明の人工皮膚を得た。得られた人工皮膚は、実施例 4 と同様にラット背部全層欠損層への貼付方法により試料への線維芽細胞の侵入性を病理組織学的に評価した。その結果を表 2 に示す。

#### 【0047】

#### 【表 2】

表 2 線維芽細胞がスポンジの上層までにかかった日数

試料	日数
実施例 4	10 日
実施例 5	7 日
実施例 6	10 日
比較例 3	14 日

#### 【0048】

【発明の効果】以上詳述したように本発明の製造方法により細胞侵入性コラーゲン製剤と人工皮膚を得ることができる。細胞侵入性コラーゲン製剤は、それを構成するコラーゲンスポンジに  $100\sim 1000\mu\text{m}$  の空孔が存在することから優れた細胞侵入性を有する。また、コラーゲンの架橋度を  $30\sim 80\%$  にすることにより、優れた物理的強度を有する。したがって、細胞侵入性コラーゲン製剤は骨修復材などの生体組織欠損部の補填剤として用いることができ、骨修復材として用いる場合、骨再構成を導く未分化間葉系細胞や骨芽細胞、毛細血管の侵入を招き、骨再構成を達成することができる。また、変性アテロコラーゲンを混合することにより、初期の細胞侵入性をより高め、かつヘパリンを添加することにより、血管侵入を促進することにより、結果的に骨再構成を高めることができる。

【0049】本発明の人工皮膚は、支持層と、 $100\sim 1000\mu\text{m}$  の空孔が存在するコラーゲンスポンジからなり優れた細胞侵入性を有する。また、コラーゲンの架橋度を  $30\sim 80\%$  にすることにより、優れた物理的強度を有する。したがって、本発明の人工皮膚は、創傷、熱傷、褥創等により組織が損傷を受けた場合に、損傷面に適用され、創面を保護し、疼痛を緩和し、細菌の感染を防止し、また早期に線維芽細胞、毛細血管が侵入し、真皮様組織を構築するため創傷の治癒が促進される。更に、移植して一定期間たった後、上部の支持層を剥がし、自家の分層植皮を行うことにより、より良い分層植皮の生着と治癒が得られる。